



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
PLAN ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS

PETRÓLEOS MEXICANOS
SUBDIRECCIÓN DE SERVICIOS DE SALUD
GERENCIA DE SERVICIOS MÉDICOS
HOSPITAL CENTRAL SUR DE ALTA ESPECIALIDAD
SERVICIO DE CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

**ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE QUEMADURAS MEDIANTE EL
EMPLEO DE UN SUBSTITUTO DÉRMICO, CONFORMADO POR UN SPRAY
DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE GRASA
CORPORAL. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN PORCINOS RAZA
YORKSHIRE-LANDRACE.**

TESIS DE POSGRADO

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

PRESENTA
DR. MIGUEL ELJURE ELJURE

ASESOR DE TESIS
DR. CUAUHTÉMOC MÁRQUEZ ESPRIELLA

México, D.F. Julio 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DR. FERNANDO ROGELIO ESPINOZA LÓPEZ
Director

DRA. JUDITH LÓPEZ ZEPEDA
Jefa Del Departamento de Enseñanza e Investigación

CUAUHTÉMOC MÁRQUEZ ESPRIELLA
Tutor de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por darme la oportunidad de vivir.

A mis padres, por su esfuerzo, amor, cuidado y apoyo durante cada uno de los días de mi vida.

A mis hermanos, por las palabras de aliento cuando más las necesité.

A María Beatríz, por todo su cariño, amor y paciencia.

A mis maestros, por tantos conocimientos y experiencias transmitidos.

Y a todos los que de forma directa o indirecta han contribuido para hacer de mi el ser humano que hoy soy.

ÍNDICE

I.	TÍTULO	5
II.	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	5
III.	ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO	6
IV.	JUSTIFICACIÓN	17
V.	HIPÓTESIS	18
	1. HIPÓTESIS NULA	
	2. HIPÓTESIS ALTERNA	
VI.	OBJETIVOS	18
	1. OBJETIVO GENERAL	
	2. OBJETIVOS PARTICULARES	
VII.	TIPO DE ESTUDIO	19
VIII.	MATERIAL Y MÉTODOS	19
	1. DEFINICIÓN DEL UNIVERSO	
	2. CRITERIOS DE SELECCIÓN	
	a. INLCUSIÓN	
	b. EXCLUSIÓN	
	c. ELIMINACIÓN	
	3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA Y PROCEDIMIENTOS	
	4. DEFINICIÓN DE VARIABLES	
	5. RECURSOS	
IX.	PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
X.	CONSIDERACIONES ÉTICAS	26
XI.	RESULTADOS	27
XII.	DISCUSIÓN	39
XIII.	CONCLUSIONES	40
XIV.	FUENTES DE INFORMACIÓN	41
XV.	ANEXOS	46
XVI.	NOTAS AL FINAL	53

I. TÍTULO

ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE QUEMADURAS MEDIANTE EL EMPLEO DE UN SUBSTITUTO DÉRMICO, CONFORMADO POR UN SPRAY DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE GRASA CORPORAL. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN PORCINOS RAZA YORKSHIRE-LANDRACE.

II. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

No existe en el mercado un producto que permita la reepitelización de quemaduras y úlceras mediante el uso de células alogénicas de amplia bioactividad; únicamente existen productos autólogos compuestos por fibroblastos y células de la piel como los queratinocitos, mismos que son obtenidos por medio de una biopsia y posteriormente cultivados *in vitro* para obtener la cantidad suficiente que permita cubrir el área afectada. Esta técnica es cara, de lenta implementación y con resultados no siempre satisfactorios, puesto que en ocasiones es necesario esperar más de dos semanas para obtener el producto en condiciones para su aplicación, periodo durante el cual el paciente permanece expuesto a agentes contaminantes.

Existen otros estudios que emplean queratinocitos y fibroblastos alogénicos en una matriz de colágena, los cuales son posteriormente liofilizados y almacenados hasta su uso; sin embargo, el producto final es un producto no vivo, por lo que el proceso de restauración no resulta tan eficiente.

El presente estudio pretende aprovechar algunas de las biomoléculas que secretan las células madre mesenquimales para causar la regeneración de heridas debidas a quemaduras o úlceras, por lo que se considera un trabajo innovador en el segmento de restauración epitelial.

La aplicación de estas células se realiza mediante la fabricación de un spray líquido que funciona como vehículo. El bioandamio creado está constituido por elementos bioabsorbibles como: factor endotelial, fibroblastos y un concentrado de interleucinas, que permiten generar un ambiente propicio para que la célula produzca el proceso biológico deseado. Las células mesenquimales pueden conservarse *in vitro* durante largos periodos, lo que les permite ser cosechadas y criopreservadas hasta su uso en la construcción del sustituto dérmico. La disponibilidad del producto es inmediata, ya que éste puede ser armado y enviado para su aplicación en condiciones óptimas. La baja inmunogenicidad de la célula mesenquimal, la secreción de interleucinas antiinflamatorias, la inducción de anergia clonal de linfocitos T citotóxicos, la secreción de interleucinas del perfil Th2, la secreción de varios factores de crecimiento celular, la secreción de proteínas de remodelación tisular como las metaloproteinasas, la secreción de factores angiogénicos como el factor de crecimiento vascular endotelial, entre otros, colocan a estas células como un potencial factor clave en el desarrollo de la medicina regenerativa.

En resumen, no existe hasta ahora un producto creado mediante biotecnología que pueda ser utilizado en la reepitelización, empleando células vivas, sin que tengan que obtenerse del mismo paciente. Por consecuencia, son largos los periodos de espera para la obtención del producto terminado. Así mismo, no existe un producto en el mercado que, además de reepitalizar, inhiba al mismo tiempo el proceso inflamatorio, el cual, de ser exacerbado, puede llegar a producir necrosis de implantes autólogos.

III. ANTECEDENTES Y MARCO TEÓRICO

Las quemaduras representan uno de los accidentes más frecuentes del ser humano. Una de las principales causas de muerte entre niños y adultos jóvenes son los accidentes

producidos en el hogar (caídas, quemaduras e intoxicaciones)ⁱ, los cuales se han convertido en un problema de salud pública, tanto por el riesgo de muerte como por las consecuencias sanitarias, psicológicas y sociales que producen, traduciéndose en una carga social y económica para los países. Irónicamente, muchos de estos accidentes son previsibles, siempre y cuando se cuente con medidas de información y educación adecuadas.

La quemadura es una lesión causada, la mayor parte de las veces, por un agente físico (vapor caliente, líquido caliente, fuego, productos químicos, electricidad, entre otros) que crea o conduce calor, provocando la destrucción de la piel de forma parcial o total.

En Estados Unidos se estima que durante 2015, se presentarán 486,000 urgencias que tendrán que ser atendidas en centros hospitalarios y 40,000 hospitalizaciones urgentes, relacionadas con quemadurasⁱⁱ.

Las causas más frecuentes de quemaduras son potencialmente evitables, puesto que principalmente se trata de accidentes domésticos, industriales o de trabajo. Los agentes causales más frecuentes son: líquidos que se encuentran en estado de ebullición (normalmente entre la población infantil); el fuego directo (adultos) y la electricidad (accidentes de trabajo)ⁱⁱⁱ. En la mayor parte de los países, las estadísticas son incompletas. En México, según datos del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), existen casi 120 millones de habitantes, de los cuales, cerca de 70 millones ha sufrido o sufrirá algún tipo de accidente; de estos, el 6% (4 millones) ha sido o tendrá que ser atendido por causas secundarias a quemaduras por lo menos una vez en su vida^{iv}, cifra que equivale al 3.5% del total de la población nacional. El lugar con mayor incidencia de accidentes por quemaduras es el hogar, con casi un 70% de los casos; después le siguen la

vía pública y la industria. El hombre tiende a quemarse con mayor frecuencia que la mujer: 68% de los casos corresponde a hombres y 32% a mujeres. La probabilidad de un hombre de sufrir quemaduras accidentales es evidentemente mayor durante la edad más productiva de su vida.

El daño en el tejido comienza cuando la temperatura excede los 40°C, y progresa rápidamente conforme la temperatura asciende. Las personas con quemaduras graves deben afrontar multitud de problemas durante su hospitalización inicial, tales como: 1) Compromiso de la vía aérea debido al edema, 2) Lesión de la vía aérea inferior por inhalación de humo, 3) Síndrome de distress respiratorio (SDRA), 4) Restricción de la movilidad de la pared torácica debido a constricción provocada por la escara rígida de las quemaduras y el edema subcutáneo, 5) Alteración de la perfusión de un miembro debido a la constricción y edema provocados por una escara 6) Manejo de líquidos y electrolitos, 7) Procedimientos quirúrgicos múltiples con problemas anestésicos en cuanto a control de líquidos, reposición de sangre y regulación de temperatura corporal, 8) Sepsis y uso de múltiples antibióticos en un huésped inmunocomprometido, 9) Crecimiento de gérmenes oportunistas como hongos y virus, 10) Problemas nutricionales debido al hipercatabolismo, 11) Control del dolor, 12) Problemas psicológicos que afectan al paciente y su entorno familiar, 13) Rehabilitación funcional y estética^v.

La reparación de heridas en la piel requiere de un complejo proceso biomolecular de migración celular, proliferación, angiogénesis y remodelación de la matriz extracelular. Este proceso involucra varias células, factores de crecimiento y la síntesis de proteínas de la matriz extracelular. Durante la regeneración de la piel, la migración celular y la remodelación del tejido, es necesaria la degradación de la matriz extracelular y la liberación de factores de crecimiento. La degradación proteolítica de la

matriz, particularmente la MMP-9, juega un papel crítico en la degradación de la matriz extracelular, ya que facilita los pasos iniciales necesarios para la angiogénesis. La alta expresión de MMP estimula la respuesta angiogénica y subsecuentemente promueve el proceso de regeneración dérmica. La angiogénesis, está sujeta a un complejo sistema de control en donde se involucran factores proangiogénicos y antiangiogénicos. Uno de los mas importantes factores proangiogénicos es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)^{vi}.

Durante los periodos tempranos del proceso de regeneración de la piel, pequeños capilares angiogénicos penetran en la matriz extracelular provisional y crean una red microvascular. En los seres humanos, después del nacimiento, las lesiones de la piel y otros tejidos se realizan por mecanismos que no permiten una regeneración apropiada del tejido original, por el contrario se promueve la formación de un tejido cicatrizal, en donde no existe la regeneración de apéndices epidérmicos como el cabello o el vello, por lo que éstos se pierden en el sitio dañado. El principal reto en la regeneración de la piel es el entendimiento de cómo la piel puede inducir la reconstrucción de las porciones dañadas sin la formación de un tejido cicatrizal o fibrótico. En estudios previos se ha comprobado que la infusión de células mesenquimales Flk1 positivas obtenidas de un ratón Balb/C que tiene pelaje blanco y que fueron infundidas vía intravenosa a un ratón C57BL/6 con pelaje negro, irradiado para su reconstitución inmunológica, el recipiente gradualmente comenzó a presentar pelaje blanco^{vii}. Los análisis inmunohistoquímicos de las áreas de la piel demostraron que los folículos con pelaje blanco contenían células derivadas del donador de células madre mesenquimales, sugiriendo que éstas se encuentran significativamente involucradas en la regeneración y funcionamiento del folículo piloso.

Las quemaduras por irradiación en la piel resultan en muerte celular, pero la estructura cutánea permanece, la cual provee un andamiaje para la regeneración cutánea. El papel de las células madre mesenquimales (MSCs, por sus siglas en inglés) en la regeneración cutánea de heridas excisionales, donde el andamiaje con las células se pierde, también ha sido investigado^{viii}. Cuando se mezclan células de médula ósea y células de la piel de embriones y son aplicadas en una herida excisional fresca, se observa la formación de epidermis, folículos pilosos y glándulas sebáceas. Si únicamente se aplican las células de la médula ósea esto no ocurre; sin embargo, si se aplican células mesenquimales en una matriz de gel, sí se induce una regeneración dérmica con apéndices foliculares y glandulares. Estos resultados sugieren que las células mesenquimales requieren la coexistencia de células de la piel y moléculas liberadas por éstas para la diferenciación y la regeneración estructural. Varios estudios han demostrado que las células mesenquimales son fáciles de expandir in vitro, y que estas células expandidas promueven la regeneración de heridas en modelos animales^{ix}. Estudios recientes indican que las heridas excisionales pueden resistir fuertemente la contracción de la piel local en ratones, permitiendo a la herida sanar a través de una granulación y reepitelización. Se ha demostrado que la aplicación tópica de MSCs alogénicas puede significativamente acelerar la regeneración de heridas cutáneas, tanto en ratones bd/db como en ratones normales. Las heridas tratadas con MSCs exhiben una velocidad significativamente más alta de cierre con una reepitelización, celularidad y angiogénesis del área regenerada. Es importante notar que las MSCs alogénicas fueron mucho más potentes en promover la reparación de la herida en comparación con los fibroblastos dérmicos, células que conforman la mayor población del estroma de la piel. Más recientemente se ha comprobado que las MSCs aceleran la regeneración de úlceras en ratones diabéticos^x. Impresionantemente, las MSCs alogénicas exhiben una sobrevivencia

similar a un injerto en comparación a las células singénicas en estos mismos modelos. Estos datos son significativamente importantes para el desarrollo de terapias basadas en MSCs. Se tiene poca información acerca del efecto de MSCs en la regeneración de heridas cutáneas en humanos. En un reporte, cinco pacientes con heridas crónicas agudas y ocho pacientes con heridas crónicas de largo estadio, recibieron células autólogas mesenquimales de médula ósea^{xi}. Estas células fueron expandidas y aplicadas tópicamente en cuatro ocasiones sobre las heridas en una matriz de fibrina; subsecuentemente el análisis de las biopsias del tejido mostró signos de sobrevida de las células implantadas y la generación de nuevas fibras elásticas en la herida. Las MSCs residentes en la piel o colocadas en la herida cutánea juegan un papel importante en el mantenimiento de la estructura y en la integridad funcional de la piel a través de factores paracrinos. Varios estudios han demostrado que las MSCs secretan una variedad de citocinas. En un análisis de proteómica, empleando microarreglos de anticuerpos para la detección de 79 citocinas humanas, el medio condicionado derivado del cultivo de las MSCs, se observó que reacciona con una gran cantidad de éstas^{xii}. Una regeneración óptima de la piel requiere una integración orquestada de varios eventos moleculares mediados por estas citocinas. Los fibroblastos son la principal población en la piel y secretan diversas moléculas involucradas en la homeostasia y en la regeneración de heridas. En un estudio comparativo donde se analizó el medio condicionado del cultivo de MSCs por una parte, y el de fibroblastos dérmicos, se logró determinar que de 81 citocinas analizadas, 31 se expresan de manera distinta^{xiii}. Es conocido que las MSCs secretan grandes cantidades de factores de crecimiento que incrementan la regeneración de lesiones en la piel, pero secretan bajas cantidades de IL-6 y osteoprotegerina en comparación con los fibroblastos. De los factores de crecimiento expresados de manera distinta, el factor de crecimiento semejante a la insulina-1 (IGF-1) es particularmente

intrigante, ya que su expresión en las MSCs es extremadamente alta. Recientemente se ha demostrado que el IGF-1 juega un papel crucial en la regeneración de varios tejidos^{xiv}. Por lo tanto, el IGF-1 por sí mismo, y junto con otras citosinas, pueden estar involucrados en la regeneración cutánea. De acuerdo con esto, el medio condicionado derivado del cultivo de las MSCs, significativamente promueve la proliferación de queratinocitos y células endoteliales *in vitro*, y las heridas tratadas con MSCs contienen cantidades adecuadas de apéndices relacionados con la piel, en comparación con las heridas tratadas únicamente con fibroblastos dérmicos. En general, el perfil de citocinas expresado por las MSCs, sugiere que éstas últimas secretan altos niveles de citosinas, las cuales incrementan el crecimiento celular y la regeneración de tejidos, mientras que los fibroblastos dérmicos expresan grandes cantidades de citocinas que promueven el proceso inflamatorio.

Las células inflamatorias participan activamente en la regeneración de heridas. Inmediatamente después de una lesión en la piel, la herida se vuelve hipóxica, lo cual crea un microambiente quimiatractivo para las células del sistema inmunológico circulantes. Específicamente los linfocitos son reclutados en la herida después de una lesión, en donde los neutrófilos, los monocitos (macrófagos) y los linfocitos secuencialmente dominan la herida, y un disturbio en esta secuencia de eventos puede causar un desorden en la regeneración de la herida. Las MSCs son capaces de secretar un gran número de citocinas como la proteína inflamatoria de macrófago (MIP)-1, MIP-2, la proteína quimioatractivo de monocito (MCP)-5, el factor derivado de célula estromal (SDF)-1 y el G-CSF, el cual afecta ciertos linajes de células inflamatorias^{xv}. Por esto es importante conocer bajo condiciones de trasplante, particularmente en la aplicación local, la influencia de las MSCs en el proceso inflamatorio de la regeneración de la herida. Se ha encontrado que ocurre una reducción en la inflamación cuando se realiza la inyección

local de MSCs en el miocardio infartado, el cual contribuye considerablemente a reducir el tejido cicatrizal en el tejido del corazón afectado^{xvi}. El análisis de células en heridas excisionales, indica que el medio condicionado derivado del cultivo de MSCs es un quimiotáctico muy fuerte para macrófagos, permaneciendo sin cambios los granulocitos reclutados, mientras que la población de células T mostró una modesta reducción. Los resultados son consistentes con los datos obtenidos *in vitro*, en los cuales, el medio condicionado derivado de MSCs fue un poderoso quimioatrayente para los monocitos (seis veces más que el medio condicionado de fibroblastos dérmicos).

Las moléculas MIP y MCP son los principales quimiotácticos para monocitos y macrófagos y juegan un papel muy importante durante la infiltración de los macrófagos durante el proceso de la restauración de la lesión. Las MSCs secretan varias veces más MIP-1 y MCP-5 que los fibroblastos dérmicos. Se sabe que los macrófagos tisulares juegan un papel muy importante en la regeneración tisular. Los resultados anteriormente descritos sugieren que las MSCs reclutan selectivamente monocitos en la herida a través de la liberación de citocinas quimioatrayentes, implicando un valor terapéutico significativo en el tratamiento de heridas crónicas con este tipo de células. La neovascularización es un paso crucial en el proceso de la regeneración cutánea.

La aplicación local de MSCs promueve la neovascularización. Los factores paracrinos de las MSCs parecen tener un papel importante en este incremento de la angiogénesis. Las MSCs son capaces de liberar altos niveles de proteínas proangiogénicas como las citocinas VEGF-a, IGF-1, el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB y la angiopoyetina 1, así como también altas cantidades de factor de crecimiento vascular e interferón alfa.

El bioandamio es un sustituto dérmico con una sustancia bioactiva de restauración tisular, constituido por un spray de células madre mesenquimales obtenidas de tejido graso de origen humano, y está construido con factor endotelial, fibroblastos y un concentrado de interleucinas (IL-12P70, IL-1BETA, TNF-ALFA, INF-ALFA, IL-8, IL-6). La innovación de un sustituto dérmico de disponibilidad inmediata, a partir de células madre mesenquimales alogénicas podría resolver importantes aspectos alrededor del tratamiento de pacientes con quemaduras y úlceras:

1. El producto está constituido por un spray que sirve como vehículo en donde se encuentran células madre mesenquimales vivas. Esto garantiza que el producto mantendrá en el lugar de la lesión un amplio espectro de moléculas bioactivas que alterará de manera positiva el microambiente de la zona dañada. Este hecho reduce de manera dramática el tiempo de hospitalización, tratamiento y cuidados relacionados a este tipo de paciente.

2. Se utilizan células madre mesenquimales de origen alogénico, mismas que pueden ser aisladas bajo consentimiento informado de tejido graso obtenidos mediante lipoaspiración de donadores sanos. Este hecho evita exponer al paciente a un daño más, ya que elimina la necesidad de tomar biopsias de piel para obtener células autólogas.

3. Las células madre mesenquimales pueden ser expandidas *in vitro* para obtener un número considerablemente alto de las mismas, que permita su empleo en dosis apropiadas para la restauración epitelial. Este hecho garantiza una amplia bioactividad celular, además de una gran biomasa resultante de los procesos de cultivo celular, mismos que no ocurren en los cultivos de células epiteliales y queratinocitos.

4. Las células expandidas pueden ser criopreservadas bajo los estándares internacionales, y ser almacenadas en tanques de nitrógeno líquido hasta su colocación en el spray que servirá como vehículo. Este hecho permite tener una producción constante, misma que garantiza la disponibilidad del producto.

5. El producto es de disponibilidad inmediata; una vez solicitado, las células criopreservadas se descongelan y en aproximadamente 120 minutos está listo el bioandamio, en cantidades que pueden cubrir hasta el 90% de la superficie corporal de un ser humano promedio. Esto permite periodos cortos de restauración epitelial con resultados que pueden ser apreciados desde distintos puntos de vista, obteniendo rápida recuperación del área dañada, sin presencia de tejido cicatrizal y/o fibrosis, y con un excelente resultado estético, mismos que beneficiarán al paciente, social y psicológicamente.

El primer grupo de células madre mesenquimales fue obtenido de la médula ósea, como una subpoblación que presenta marcadores moleculares distintos del linaje hematopoyético. Las MSCs pueden ser aisladas tanto de embriones como de individuos adultos. De igual forma se encuentran en los tejidos adiposo y endometrial en grandes cantidades. Son consideradas células troncales o estaminales y pueden ser expandidas *in vitro* sin perder su inmadurez. Su plasticidad celular es inmensa, puesto que cuando son cultivadas en mezclas específicas de interleucinas y factores de crecimiento, pueden diferenciarse a linajes mesodérmicos, ectodérmicos y endodérmicos.

Las células madre mesenquimales son capaces de interactuar con las células del sistema inmunológico, generando procesos de inmunomodulación e inmunotolerancia. Por todo lo anterior, las MSCs son consideradas células de donación

universal. Hasta la fecha de elaboración de este documento, no se han presentado eventos adversos adjudicados al uso de células madre mesenquimales.

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente no se cuenta con un tratamiento efectivo para lograr la restauración epitelial de tejido alterado por una quemadura, y tampoco con un proceso que induzca la formación de úlceras en la piel. Por lo tanto es importante que se desarrollen soluciones efectivas que busquen cubrir las deficiencias que hasta este momento se presentan. El presente proyecto plantea el uso de un dispositivo construido por ingeniería de tejidos que promueva la reepitelización de manera más eficiente de lo que hasta ahora han demostrado otros productos, y cuyos resultados presentan problemas en los costos de producción, tiempo de tratamiento y eficacia terapéutica.

Es indispensable crear tecnologías que permitan una apropiada recuperación y que disminuyan los costos operativos de consulta y tratamiento de los pacientes. El costo social, económico y psicológico que tiene una quemadura sin el adecuado tratamiento, genera un impacto importante en los individuos y familias que padecen estos desafortunados eventos.

La fabricación de un sustituto dérmico de disponibilidad inmediata a partir de células madre mesenquimales alogénicas, puede significar un enorme avance en nuestro país para el tratamiento del paciente con quemaduras, ya sea pediátrico o adulto. La evidencia científica ha demostrado la universalidad de las células estromales mesenquimales, perfilándolas como la materia prima ideal en la restauración de órganos y tejidos, con la ventaja de poder contar con poblaciones suficientes de estas células, provenientes de donadores sanos, para su uso en la construcción de sustitutos dérmicos y su aplicación terapéutica en quemaduras y úlceras. Actualmente existen aproximadamente 200 protocolos clínicos aprobados por la *US Food and Drug Administration* (FDA, por sus siglas en inglés) empleando células madre mesenquimales,

obtenidas de diversos orígenes, tanto de tejidos adultos como de tejidos extraembrionarios, de forma tanto autóloga como alogénica. Las propiedades antiinflamatoria, de inmunomodulación e inmunotolerancia, permiten utilizar células madre mesenquimales sin la necesidad de verificar histocompatibilidad entre donador y receptor.

Esta investigación pretende explorar los resultados de la aplicación de un producto de disponibilidad inmediata, que podría reducir ampliamente los costos de tratamiento de pacientes quemados y/o ulcerados.

V. HIPOTESIS

1. **Hipótesis nula:** Uso de bioandamio de células madre mesenquimales en spray como apósito en quemaduras de segundo grado superficial y profundo, después de 7 y 21 días de seguimiento en porcinos de experimentación, no es efectivo y no muestra ventajas contra el uso de apósitos de Epifast o Tegaderm.
2. **Hipótesis alterna:** Uso de bioandamio de células madre mesenquimales en spray como apósito en quemaduras de segundo grado superficial y profundo, después de 7 y 21 días de seguimiento en porcinos de experimentación, es efectivo y muestra ventajas contra el uso de apósitos de Epifast o Tegaderm.

VI. OBJETIVOS

1. **General:** Comparar el grado de restauración de lesiones dérmicas por quemadura mediante el uso de apósitos de queratinocitos (Epifast), apósito (Tegaderm) y bioandamio de células madre mesenquimales en porcinos raza Yorkshire-Landrace.
2. **Particulares:**

- a. Evaluar en el modelo animal el efecto de los sustitutos dérmicos desarrollados en la resolución de heridas causadas por quemaduras y úlceras a los 7 y 21 días.
- b. Describir eventos adversos.
- c. Evaluar las condiciones histopatológicas (reepitelización, proliferación fibroblástica, capas de espesor, infiltrado inflamatorio, porcentaje linfoide y polimorfonuclear, angiogénesis y capilares).

VII. TIPO DE ESTUDIO:

Estudio experimental, analítico, longitudinal y prospectivo en porcinos en el Servicio de Bioterio y Cirugía Experimental del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos.

VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. **UNIVERSO:** Se utilizaron porcinos del Servicio de Bioterio y Cirugía Experimental del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos.

MUESTRA: 10 porcinos

2. CRITERIOS DE SELECCIÓN

- a. **Inclusión:** Porcinos clínicamente sanos, no utilizados en algún otro proyecto de investigación, sin antecedentes de quemaduras.
- b. **Exclusión:** Animales clínicamente enfermos, con antecedentes de quemaduras o incluidos en otro proyecto de investigación.

c. **Eliminación:** Animales fallecidos durante el evento quirúrgico o el seguimiento.

3. SELECCIÓN DE LA MUESTRA Y PROCEDIMIENTOS

Se seleccionaron 10 porcinos para experimentación del Servicio de Bioterio y Cirugía Experimental del Hospital Central Sur de Alta Especialidad de Petróleos Mexicanos, con base en los criterios ya antes mencionados, los cuales se colocaron en jaulas individuales a temperatura ambiente. Los porcinos fueron proporcionados por la empresa BIOINVERT, especializada en animales de laboratorio; cruce de las razas Yorkshire-Landrace clínicamente sanos con pesos de 10.400 Kg a 16.200 Kg. Se alimentaron con concentrado comercial marca Purina, etiqueta verde 25-60, cuya tabla nutricional es:

Humedad	12% Máximo
Proteína	15% Mínimo
Grasa	1.50 Mínimo
Fibra cruda	10% Máximo
Cenizas	8% Máximo
Calcio	0.65 Mínimo
Fósforo	0.45 Mínimo
E.L.N.	53.5% P/DIF

El alimento se administró a libre acceso al igual que el agua potable. Se evaluó de manera individual y grupal el comportamiento de los porcinos. Se tomaron los pesos individuales de los porcinos para cuantificar su ganancia diaria como un indicador indirecto de bienestar animal.

TÉCNICA QUIRÚRGICA

Todas las cirugías se realizaron bajo condiciones estériles con el porcino descansando en posición decúbito ventral. Treinta minutos previos a la cirugía se administraron 1-5 gr. de penicilina IV.

La técnica anestésica fue general con sedación. Se llevo a cabo con una combinación de anestésico: Tiletamina/zolazepam (ZOLETIL), 3.5mg IM; tranquilizante, relajante muscular: Xilazina PROCIN EQUUS 1.32mg, IM; analgésico: Tramadol (TRADOL) 50mg, IM.

Dicha combinación proporcionó una adecuada anestesia y analgesia para este protocolo, 15 minutos después se realizaron las quemaduras.

Se realizaron 6 quemaduras de segundo grado profundo, de aproximadamente 5 cm cada una, en dorso de tronco de cada porcino. Las quemaduras se infringieron con una placa metálica por contacto durante 3 segundos.

GRUPOS DE ESTUDIO

Se dividieron en 2 grupos de 3 heridas cada uno para ser evaluadas a los 7 días (grupo A) y 21 días (grupo B). Una de las heridas, fue manejada como se realiza convencionalmente en el hospital, es decir, mediante la aplicación de apósitos de queratinocitos cultivados de 7 x 8 cm² (Epifast, E); en otra herida, se colocó únicamente cubierta de apósito (Tegaderm, C) y en la tercera herida se aplicó el bioandamio de células madre mesenquimales en spray (cantidad celular: 1 x 10⁶ por cada 100 µL) (CM) (Figura 1).



Figura 1. Inducción de quemaduras para cada grupo de estudio.

El grupo A, fue observado por un periodo de 7 días, con la aplicación diaria del bioandamio de células madre mesenquimales en spray en la herida tratada con este método; las otras 2 heridas de este grupo, fueron manejadas con el apósito de Epifast y Tegaderm, respectivamente, permaneciendo cubiertas durante los 7 días del tratamiento.

El grupo B, fue observado por un periodo de 21 días, con aplicación semanal durante 3 semanas del bioandamio de células madre mesenquimales en spray en la herida manejada con este método; las otras 2 heridas de este grupo, fueron tratadas con el apósito de Epifast y Tegaderm, respectivamente, permaneciendo cubiertas durante los 21 días.

Al término de los 7 y 21 días, se tomaron biopsias de las tres heridas de este grupo y se enviaron para estudio histopatológico. En el postoperatorio, se aplicó como antibiótico preventivo, una ampolla de penicilina benzatínica combinada de 1,200,00UI I.M. y como analgésico, metamizol sódico vía oral por 2 días.

TOMA DE BIOPSIAS

Para la toma de las biopsias, se anestesió a los animales con la misma combinación anestésica y analgésica. Se realizó mediante una biopsia excisional de 1cm x 2cm, con una hoja de bisturí del número 10; se obtuvo una biopsia por cada quemadura provocada.

A los 7 días de la quemadura del grupo A, se tomaron 3 biopsias por cada porcino (una biopsia por cada herida, es decir, 3 muestras por cerdo), etiquetando la fecha y la muestra a la que correspondió cada toma (quemadura testigo, quemadura con bioandamio de células madre mesenquimales y quemadura con Epifast).

A los 21 días de la quemadura del grupo B, se tomaron 3 biopsias por cada porcino (una biopsia por cada herida, es decir, 3 muestras por cerdo), etiquetando la fecha y la muestra a la que correspondió cada toma (quemadura testigo, quemadura con bioandamio de células madre mesenquimales y quemadura con Epifast) (Figura 2).

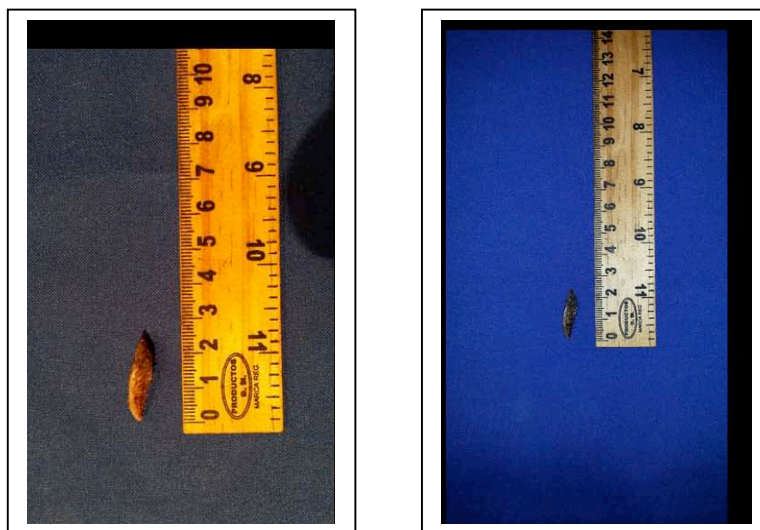


Figura 2. Toma de las biopsias.

Todas las muestras fueron puestas en un tubo de ensayo con formol, tapado y herméticamente sellado. Las muestras fueron enviadas al laboratorio de histopatología

para realizar un análisis de morfología con técnicas de hematoxilina y eosina y/o tricrómico de massón. Se solicito especial atención en la presencia o ausencia de apéndices dérmicos (glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas y folículos pilosos).

Para definir la eficacia de la mejoría, se tomo en cuenta la reepitelización, proliferación fibroblástica, capas de espesor, infiltrado inflamatorio, porcentaje linfoide y polimorfomuclear, angiogénesis y capilares en el sitio de la quemadura comparando el control (Tegaderm) con las áreas donde se uso Epifast y el spray de células madre mesenquimales (Biandamio).

4. DEFINICIÓN DE VARIABLES

Variables	Escala de medición	Categorías
Tipo de material	Cualitativa nominal	Epifast Tegaderm (control) Bioandamio (células madre mesenquimales)
Reepitelización	Cualitativa ordinal	Mínimo Parcial Total
Proliferación fibroblástica	Cualitativa ordinal	Mínima Leve Moderada
Capas de espesor	Cuantitativa discreta	Numero de capas
Infiltrado inflamatorio	Cualitativa ordinal	Leve Moderado Denso
Porcentaje linfoide	Cuantitativa discreta	%
Porcentaje polimorfonucleares	Cuantitativa discreta	%
Angiogénesis	Cualitativa ordinal	Mínima Leve Moderada Intensa
Capilares	Cuantitativa discreta	Numero de capilares
Eficacia del tratamiento	Cualitativa ordinal	Malo Regular Bueno

5. RECURSOS

- a. Epifast
- b. Tegaderm
- c. Bioandamio de células mesenquimales
- d. Báscula
- e. Placa metálica
- f. Guantes
- g. Solución estéril
- h. Medicamentos (sedantes, analgésico y antibiótico)

IX. PLAN DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se empleó estadística descriptiva para variables cualitativas, y para las cuantitativas, medidas de tendencia central y dispersión. Para comparar los grupos de estudio se empleó la prueba Kruskal Wallis ($p < 0.05$).

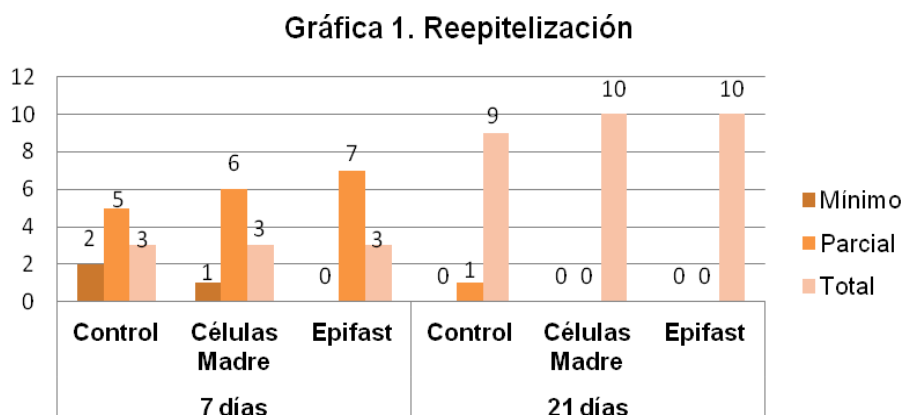
X. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con los lineamientos descritos por la NOM-062-ZOO-1999 por lo cual no fue necesaria carta de consentimiento informado.

Aunado a lo anterior, el protocolo fue aprobado para su realización por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE) del hospital, con el fin de preservar el tratamiento ético de los animales conforme a las normas antes mencionadas.

XI. RESULTADOS

Se incluyeron 10 muestras por cada grupo de estudio (Control, Epifast y Células Madre). Del total de muestras (n=30) analizadas a los 7 días, un 60% obtuvo un grado parcial de reepitelización (18 muestras), siendo mayor en el grupo de Epifast con 7 muestras (38%). De las muestras analizadas a los 21 días, el 96.6% obtuvo un grado de reepitelización total (29 muestras). Los grupos de Células Madre y Epifast, mostraron reepitelización total para todas las muestras (Gráfica 1).



Con respecto al porcentaje de reepitelización, a los 7 días, los 3 grupos obtuvieron un 30% de sus muestras con el 100% de reepitelización. El grupo de Células Madre presentó en el 90% de sus muestras un grado de reepitelización del 35% o mayor; los grupos de Epifast y Control, 80% y 70%, respectivamente (Tabla 1). A los 21 días, todas las muestras presentaron el 100% de reepitelización.

Tabla 1. Porcentaje de reepitelización 7 días

Porcentaje de reepitelización (%)	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
5	1	0	0
10	1	0	0
15	0	1	0
20	0	0	1
25	0	0	1
30	1	0	0
35	0	4	0
40	1	0	0
50	0	0	1
60	0	1	1
65	1	0	0
70	1	0	0
80	0	0	1
90	0	1	2
95	1	0	0
100	3	3	3

En relación con el número de capas de espesor, de las muestras analizadas a los 7 días, el 60% de las biopsias del grupo Control presentó entre 1 y 6 capas de reepitelización, entre 2 y 6 capas para el grupo de Células Madre y entre 1 y 7 para el de Epifast.

De las muestras analizadas a los 21 días se observó que el grupo de Células Madre presentó un mínimo de capas de espesor de 7 a 9 (30% de las biopsias) y un máximo de 12 a 14, en contraste con los grupos Control y Epifast, los cuales obtuvieron mínimos de 1 a 4 y de 5 a 7 capas, así como máximos de 10 a 12 y de 12 a 13 capas, respectivamente. (Tabla 2).

Tabla 2. Número de capas de espesor

Capas de espesor a los 7 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
1 a 3	3	1	0
1 a 4	0	1	0
1 a 5	2	0	2
1 a 6	1	0	0
2 a 10	0	0	1
2 a 5	0	2	0
2 a 6	1	2	0
3 a 6	0	2	2
3 a 7	0	0	2
3 a 8	0	0	1
4 a 10	1	0	0
4 a 9	0	0	1
5 a 12	0	0	1
5 a 9	0	1	0
6 a 10	1	0	0
6 a 9	0	1	0
Más de 10	1	0	0

Capas de espesor a los 21 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
1 a 4	1	0	0
5 a 7	0	0	1
6 a 8	2	0	2
7 a 9	0	3	0
8 a 10	2	2	0
8 a 12	1	1	0
9 a 10	0	2	1
9 a 11	1	0	2
9 a 12	0	1	0
9 a 13	1	0	0
9 a 14	0	0	1
10 a 12	2	0	1
11 a 13	0	0	1
12 a 13	0	0	1
12 a 14	0	1	0

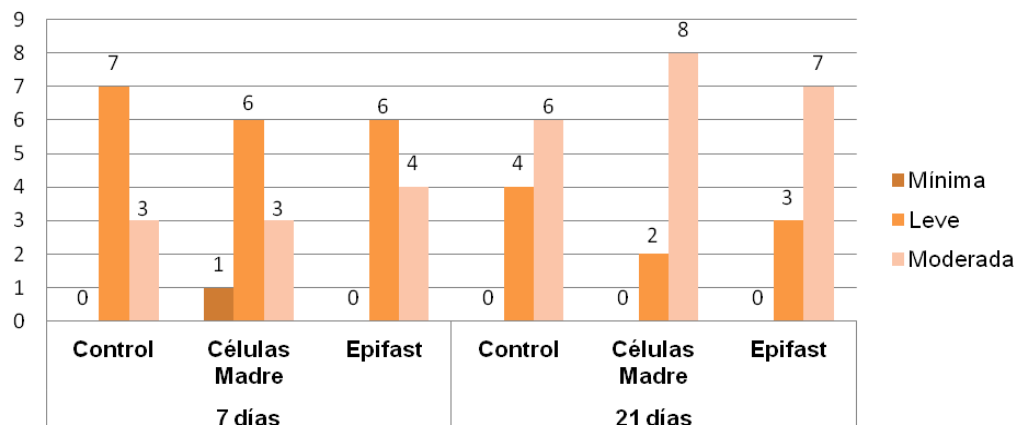
Con relación a la proliferación fibroblástica, a los 7 días la mayoría obtuvo una proliferación leve (19 muestras), siendo más frecuente en el grupo Control (7 muestras).

A los 21 días la mayor parte de las muestras tuvo una proliferación fibroblástica

moderada (21 muestras), con predominancia en el grupo de Células Madre (8 muestras).

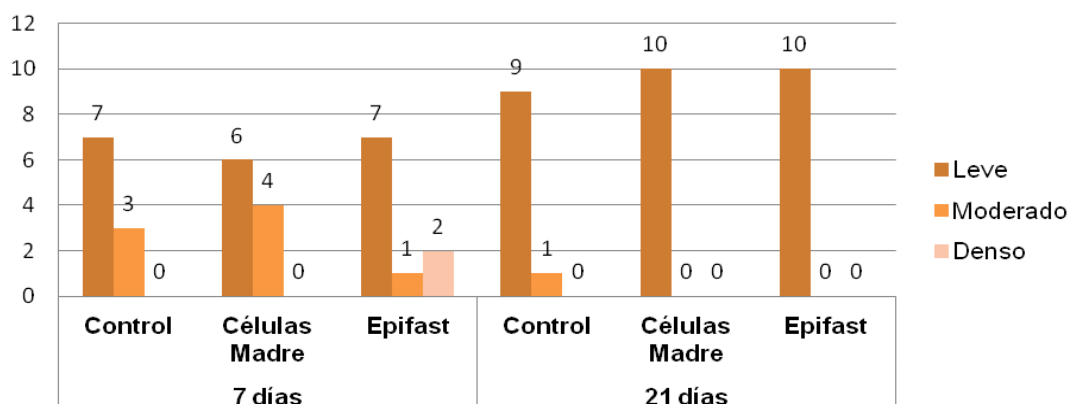
No se presentó ningún caso de proliferación de grado mínimo a los 21 días (Gráfica 2).

Gráfica 2. Proliferación Fibroblástica



Por otro lado, la mayor parte de las muestras obtuvo un grado de infiltrado inflamatorio leve a los 7 y 21 días (20 muestras y 29 muestras, respectivamente). A los 7 días se observó una mayor frecuencia de infiltrado inflamatorio leve en los grupos Control y Epifast (7 muestras de cada grupo); sin embargo, el grupo de Células Madre presentó infiltrado inflamatorio moderado en un 40% de sus muestras. A los 21 días, se observó que todas las muestras de Células Madre y Epifast presentaron infiltrado inflamatorio leve. Ningún caso presentó infiltrado inflamatorio denso (Gráfica 3).

Gráfica 3. Grado de infiltrado inflamatorio



En relación con el infiltrado inflamatorio, de las muestras analizadas a los 7 días, se observó un porcentaje de infiltrado linfoide de 30% en 3 muestras del grupo de Células Madre y 5 del grupo de Epifast, así como de 40% en 3 muestras del grupo de Células Madre. El grupo Control presentó un infiltrado linfoide de 70% en 3 de sus muestras.

De las muestras obtenidas a los 21 días, el grupo de Células Madre presentó un infiltrado linfoide de 90% en 5 muestras; el grupo Epifast de 80% y 90% en 4 muestras cada uno y el grupo Control de 80% en 4 muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentaje linfoide

% Linfoide a los 7 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
20	2	1	2
30	1	3	5
40	1	3	1
50	1	0	1
60	1	2	0
70	3	0	0
80	1	1	1
% Linfoide a los 21 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
30	0	0	1
40	1	0	0
50	1	2	1
65	0	1	0
70	2	2	0
80	4	0	4
90	1	5	4
95	1	0	0

En relación con el porcentaje de infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares, para las muestra analizadas a los 7 días, el grupo Control presentó un 30% en 3 de sus muestras; el grupo de Células Madre un 60% y 70% en 3 muestras cada uno y el grupo Epifast un 70% en 5 muestras.

De las muestras obtenidas a los 21 días, el grupo Control presentó un infiltrado inflamatorio de polimorfonucleares de 20% en 4 muestras; el 50% de las muestras del grupo de Células Madre presentó entre 30 y 50% de infiltrado y el grupo de Epifast un 10 y 20% con 4 muestras en cada uno (Tabla 4).

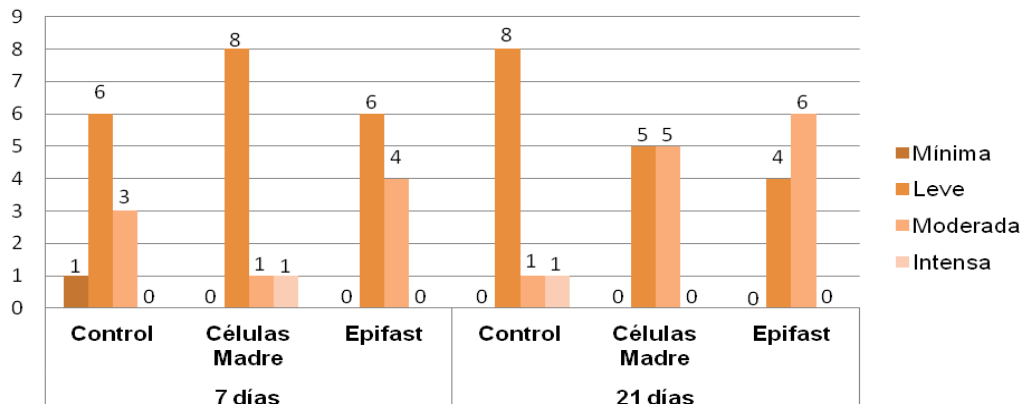
Tabla 4. Porcentaje de polimorfonucleares

% polimorfonucleares a los 7 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
20	1	1	1
30	3	0	0
40	1	2	0
50	1	0	1
60	1	3	1
70	1	3	5
80	2	1	2
% polimorfonucleares a los 21 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
5	1	0	0
10	1	5	4
20	4	0	4
30	2	2	0
35	0	1	0
50	1	2	1
60	1	0	0
70	0	0	1

En relación con el grado de angiogénesis, las muestras analizadas a los 7 días presentaron mayor frecuencia en el grado leve en los tres grupos; grado moderado en 4 muestras del grupo de Epifast y grado intenso en 1 muestra del grupo de Células Madre.

De las muestras analizadas a los 21 días, se observa que el 80% del grupo Control obtuvo únicamente un grado leve de angiogénesis, mientras el grupo de Células Madre presentó 5 muestras con grado leve y 5 con grado moderado; el grupo de Epifast presentó 4 muestras con grado leve y 6 con grado moderado (Gráfica 4).

Gráfica 4. Grado de Angiogénesis



En relación con el número de capilares, de las muestras analizadas a los 7 días, el 60% de las biopsias del grupo Control presentó entre 1 y 5 capilares; en el grupo de Células Madre, el 50% de las muestras presentó entre 2 y 5 capilares y el 20% entre 4 y 8. En el grupo de Epifast, el 70% de las muestras presentó mínimo 2, máximo 6 capilares, y sólo un 10% alcanzó los 7 capilares.

De las muestras analizadas a los 21 días, el 70% de las biopsias del grupo Control únicamente presentó entre 1 y 2 capilares. En el grupo de Células Madre, un 40% de las muestras presentó de 1 a 2 capilares; otro 40% entre 2 y 3, e incluso un 10% alcanzó a obtener en 3 y 4 capilares. En el grupo de Epifast, un 50% presentó de 1 a 2 capilares y el 50% restante de 2 a 3.

Tabla 5. Número de Capilares

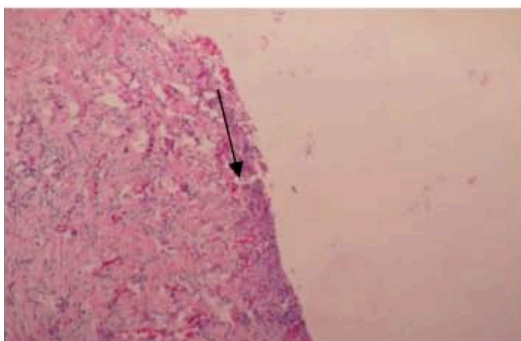
Número de Capilares a los 7 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
1 a 2	1	0	0
1 a 3	2	0	1
1 a 4	0	1	0
1 a 5	1	1	0
2 a 3	2	1	2
2 a 4	0	2	2
2 a 5	2	2	1
3 a 5	1	1	0
3 a 6	0	0	2
3 a 7	0	0	1
4 a 6	0	1	1
4 a 7	1	0	0
6 a 8	0	1	0
Número de Capilares a los 21 días	Grupo		
	Control	Células Madre	Epifast
0 a 1	1	0	0
1 a 2	7	4	5
1 a 3	0	1	0
2 a 3	1	4	5
3 a 4	0	1	0
3 a 5	1	0	0

HISTOPATOLOGÍA DEL GRUPO CONTROL

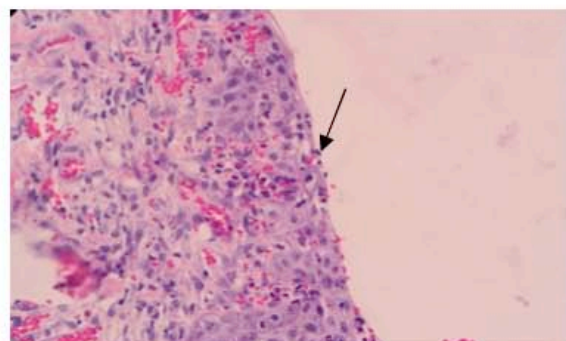
El grupo Control, presenta una superficie epidérmica rugosa café oscura. Al corte seriado, la dermis es sólida, de coloración blanquecina, homogénea con áreas de congestión y focos de hemorragia. Se realizaron cortes y se incluyeron totalmente en una cápsula para su estudio (Figura 3).



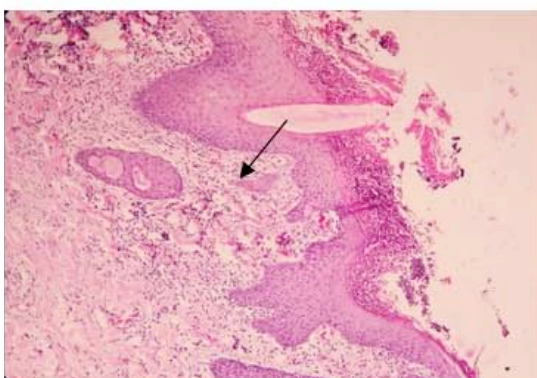
Figura 3. Descripción Macroscópica.



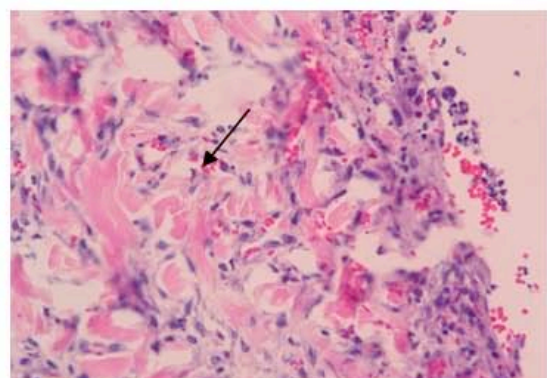
Vista panorámica de las zonas ulcerada (flecha) (4x)



Brotos de reepitelización (flecha) (10x)



Leve infiltrado inflamatorio agudo superficial y peri vascular (10x)



Áreas de proliferación fibroblástica (40x)

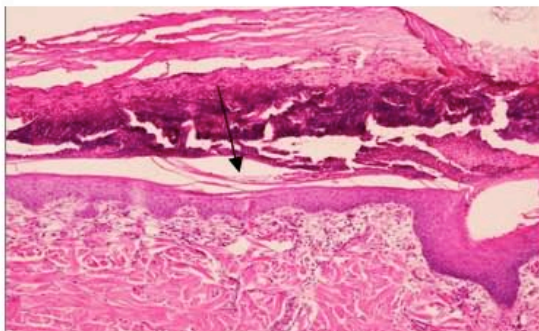
Figura 4. Descripción Microscópica.

HISTOPATOLOGÍA DEL GRUPO CÉLULAS MADRE

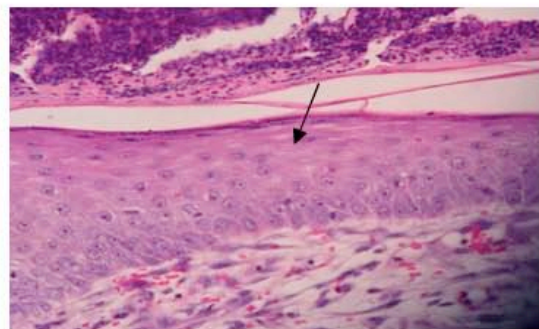
El grupo de Células Madre presenta una superficie epidérmica rugosa, que va de blanquecina a café oscura. Al corte seriado, la dermis es sólida, de coloración blanquecina, homogénea con áreas de congestión y focos de hemorragia. Se realizaron cortes y se incluyeron totalmente en una cápsula para su estudio (Figura 5).



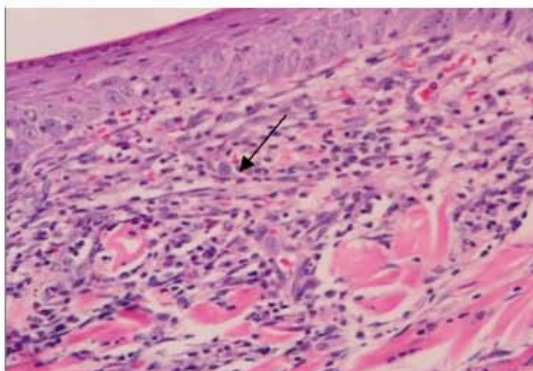
Figura 5. Descripción Macroscópica.



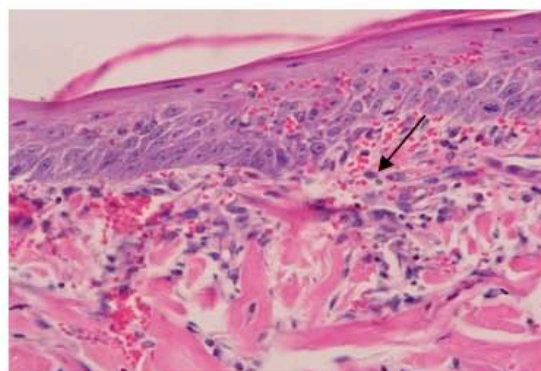
Vista panorámica de las zonas reepitelizadas (flecha) (4x)



Epitelio neo formado de hasta 9 capas de espesor (flecha) (10x)



Leve infiltrado inflamatorio misto y proliferación fibroblástica (10x)



Zonas de angiogénesis (40x)

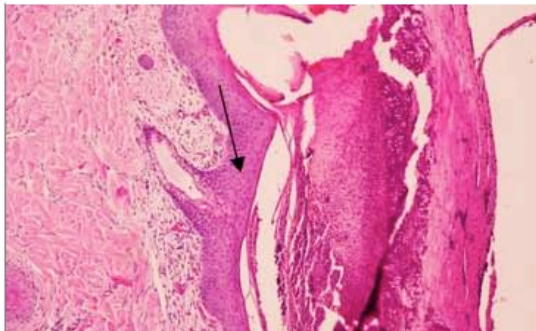
Figura 6. Descripción Microscópica.

HISTOPATOLOGÍA DEL GRUPO EPIFAST

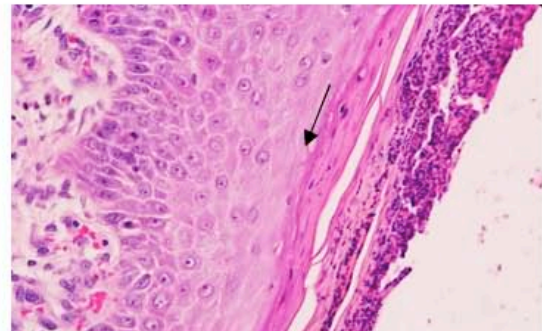
El grupo de Epifast presenta una superficie epidérmica rugosa, que va de blanquecina a café oscura. Al corte seriado, la dermis es sólida de coloración blanquecina, homogénea con áreas de congestión y focos de hemorragia. Se realizaron cortes y se incluyeron totalmente en una cápsula para su estudio (Figura 7).



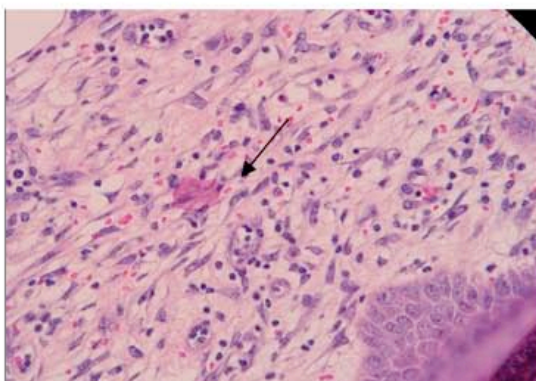
Figura 7. Descripción Macroscópica.



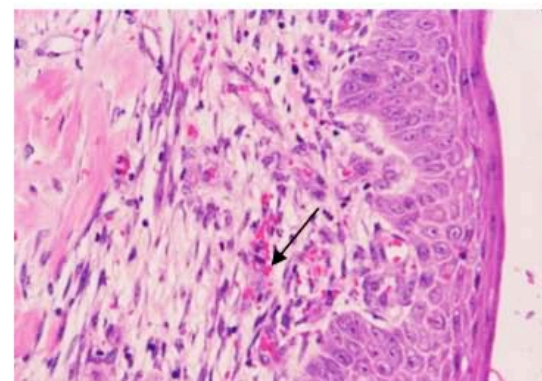
Vista panorámica de las zonas reepitelizadas (flecha) (4x)



Epitelio neo formado de hasta 9 capas de espesor (flecha) (10x)



Leve infiltrado inflamatorio misto y proliferación fibroblástica (10x)



Zonas de angiogénesis (40x)

Figura 8. Descripción Microscópica.

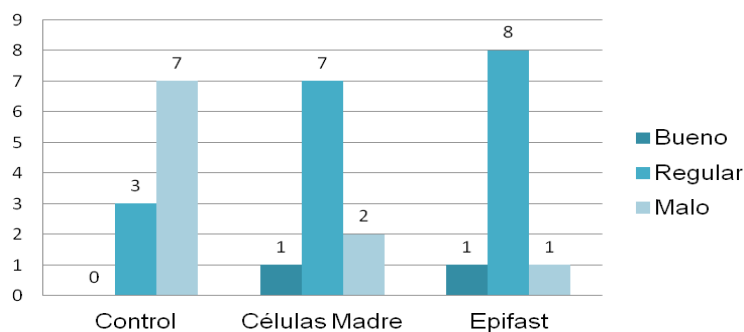
CATEGORIZACIÓN DE LOS DATOS HISTOLÓGICOS

Se realizó una categorización de variables con el objetivo de determinar qué tratamiento, o tratamientos, suponen los mayores beneficios para los pacientes. Los resultados fueron clasificados como buenos, regulares o malos, de acuerdo con los datos histológicos presentados anteriormente.

El 70% de los tratamientos del grupo Control fue clasificado como malo y el 30% restante únicamente como regular. El grupo de Células Madre, presentó un 70% de tratamientos regulares, 10% de tratamientos buenos y solamente un 20% fue catalogado como malo. El grupo de Epifast obtuvo los mejores resultados, muy parecidos a los del grupo de Células Madre: 80% de tratamientos regulares, 10% buenos y 10% malos.

Es evidente que los grupos de Células Madre y Epifast presentan resultados equiparables, por lo que ambos tratamientos podrían funcionar como sustitutos perfectos.

Gráfica 8. Categorización de los datos histológicos



Para hacer posible la comparación de resultados entre los tres grupos de estudio con respecto al grado de reepitelización, proliferación fibroblástica, grado inflamatorio y grado de angiogénesis, tanto a los 7 como a los 21 días, se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), lo que pareciera indicar que, por lo menos estadísticamente, los tres grupos analizados presentan

resultados muy semejantes. Sin embargo, al categorizar en datos clínicos, sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos ($p=0.012$), obteniendo un mayor número de casos buenos en el grupo de Células Madre y Epifast.

Por otro lado, al comparar el grupo de Células Madre con el grupo Control, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.045$), presentando mejores resultados el grupo de Células Madre. Al comparar Células Madre únicamente con el grupo de Epifast, no se encontraron diferencias significativas ($p=0.739$), por lo que puede considerarse que ambos tratamientos son igual de efectivos.

XII. DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos, puede afirmarse que el uso de células madre mesenquimales en el tratamiento de quemaduras para el modelo porcino, produce una restauración de la piel extremadamente semejante a la obtenida mediante el uso de Epifast. El máximo beneficio pudo observarse a los 21 días.

Con respecto a la reepitelización, a los 21 días se obtuvo el 100% en los grupos de Células Madre y de Epifast; estos mismos grupos obtuvieron un infiltrado inflamatorio leve para el 100% de sus muestras durante el mismo periodo. La proliferación fibroblástica fue moderada para ambos grupos (80% y 70% de sus muestras, respectivamente) al término de los 21 días. Se observan resultados similares con respecto a la angiogénesis: 50% y 60% de las muestras obtuvieron un grado moderado de formación de vasos sanguíneos, respectivamente.

Durante el estudio, no se presentaron efectos adversos derivados del uso de células madre mesenquimales. Así mismo, el tiempo de fabricación del bioandamio es

menor que el empleado para la aplicación de otros tratamientos reportados en la literatura y practicados clínicamente.

La evidencia científica sugiere que el producto es adecuado para propiciar una reepitelización de tiempos reducidos, así como para evitar la generación de tejido cicatrizal y fomentar la regeneración de apéndices dérmicos.

Los alcances de la presente investigación son:

- Justificar la elaboración del bioandamio a nivel industrial, ya sea en el corto o mediano plazo.
- Empezar la creación de un banco de células madre que permita hacer más eficiente el tratamiento de pacientes quemados y/o ulcerados.

Evidentemente, lo anterior tendrá que realizarse de acuerdo a las Normas de Correcta Fabricación (NCF), a los lineamientos establecidos por COFEPRIS y a otros estándares y requerimientos obligatorios.

XIII. CONCLUSIONES

Se comprobó la eficacia del uso de células madre mesenquimales en el tratamiento de quemaduras, encontrando resultados equiparables con aquellos obtenidos mediante el uso de Epifast. Ambos tratamientos producen resultados superiores a los observados en el grupo Control.

La terapia con células madre mesenquimales en spray demostró ser una alternativa efectiva y aplicable para el tratamiento de quemaduras.

XIV. FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochemical and Biochem Biophys Res Commun.* 1999 Nov; 265(1): 134-9.
2. Barry F1, Boynton RE, Liu B, Murphy JM. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp Cell Res.* 2001 Aug 15; 268(2): 189-200.
3. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene.* 2003 Sep 29; 22(42): 6524-36.
4. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone.* 1997 Sep; 21(3): 225-35.
5. Bruder SP, Ricalton NS, Boynton RE, Connolly TJ, Jaiswal N, Zaia J, et al. Mesenchymal stem cell surface antigen SB-10 corresponds to activated leukocyte cell adhesion molecule and is involved in osteogenic differentiation. *J Bone Miner Res.* 1998 Apr; 13(4): 655-63.
6. Cheifetz S, Bellón T, Calés C, Vera S, Bernabeu C, Massagué J, Endoglin is a component of the transforming growth factor-beta receptor system in human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992 Sep 25; 267(27): 19027-30.
7. De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003; 174(3): 101-9.
8. Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple

- colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology*. 1999 Nov; 107(2): 275-81.
9. D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*. 1999 Jul; 14(7): 1115-22.
 10. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria of defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society of Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006 8: 315-317.
 11. Dragoo JL¹, Samimi B, Zhu M, Hame SL, Thomas BJ, Lieberman JR, et al. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br*. 2003 Jul; 85(5): 740-7.
 12. Flores FE, Montesinos JJ, Flores GP, Gutierrez EG, Arana RM, Castillo MS, Pérez CA. Functional analysis of myelodysplastic, syndromes-derived mesenchymal stem cells. *Leuk Res*. 2008 Sep; 32(9):1407-16. doi: 10.1016/j.leukres
 13. Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage*. 2003 Jan; 11(1): 55-64.
 14. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. *Bone*. 1992; 13(1): 69-80.

15. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4; 418(6893): 41-9.
16. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant*. 1997 Mar-Apr;6(2):125-34.
17. Li J, Zhang Y, Kirsner R. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. *Microworld Res. Tech*. 2003; 60:107-14.
18. Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng*. 2002 Oct;8(5): 739-51.
19. Majumdar MK1, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, et al. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *J Biomed Sci*. 2003 Mar-Apr; 10(2): 228-41.
20. Martin I, Muraglia A, Campanile G, Cancedda R, Quarto R. Fibroblast growth factor-2 supports ex vivo expansion and maintenance of osteogenic precursors from human bone marrow. *Endocrinology*. 1997 Oct; 138(10): 4456-62.
21. McBride C, Gaupp D, Phinney DG. Quantifying levels of transplanted murine and human mesenchymal stem cells in vivo by real-time PCR. *Cytotherapy*. 2003; 5(1): 7-18.
22. Murphy JM, Dixon K, Beck S, Fabian D, Feldman A, Barry F. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis. *Arthritis Rheumatism*. 2002 Mar; 46(3): 704-13.
23. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 2003 Dec;48(12):3464-74

24. Nakahara H, Bruder SP, Haynesworth SE, Holecek JJ, Baber MA, Goldberg VM, et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*. 1990; 11(3): 181-8.
25. Nöth U, Osyczka AM, Tuli R, Hickok NJ, Danielson KG, Tuan RS. Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *J Orthop Res*. 2002 Sep; 20(5): 1060-9.
26. O'Driscoll SW, Saris DB, Ito Y, Fitzimmons JS. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. *J Orthop Res*. 2001 Jan; 19(1): 95-103.
27. Oreffo RO, Bord S, Triffitt JT. Skeletal progenitor cells and ageing human populations. *Clinical Science*. 1998 May; 94(5): 549-55.
28. Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8; 100(14): 8407-11
29. Otrock Z, Mahfouz R, Makarem J et al. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood cell, Molecules, and Diseases* 2007; 39:212-220.
30. Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem*. 1999 Mar 15; 72(4): 570-85.
31. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK., Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-147.
32. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997; 276: 71-4.

33. Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res.* 2002 Mar;307(3):321-7. Epub 2002 Feb 26.
34. Roh c, Lyle S. Cutaneous stem cell and Wound Healing. *Pedi- atric Research* 2006; 59:100R-103R.
35. Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1919-25; discussion 1926.
36. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991 Jul 1; 78(1): 55-62.
37. Sottile V, Halleux C, Bassilana F, Keller H, Seuwen K. Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone.* 2002 May; 30(5): 699-704.
38. Tuli R, Seghatoleslami MR, Tuli S, Wang ML, Hozack WJ, Manner PA, et al. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol Biotechnol.* 2003 Jan; 23(1): 37-49.
39. Wong T, Mcgrath J.A, Navsaria H. The role of fibroblasts in tissue engineering and regeneration. *British Journal of Dermatology* 2007; 156:1149-55.
40. Zarnett R, Salter RB. Periosteal neochondrogenesis for biologically resurfacing joints: its cellular origin. *Can J Surg.* 1989 May; 32(3): 171-4.

XV. ANEXOS

ANEXO 1

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

LILIA ISABEL OCHOA MUÑOZ, Coordinadora General Jurídica de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; artículos 4o. fracción III, 12 fracción XIV, 17 y 18 fracción VI de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 15 fracciones XXX y XXXI del Reglamento Interior de esta dependencia, y

CONSIDERANDO

Que es atribución de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación formular, aplicar y, en el ámbito de su competencia, expedir las disposiciones y medidas zoosanitarias necesarias para verificar y certificar el cumplimiento de las mismas.

Que es función de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, fomentar la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio mediante la aplicación de técnicas tendientes a garantizar la producción, proteger la salud y favorecer el buen uso de los animales de laboratorio.

Que en la actualidad, la falta de planeación en la producción de animales de laboratorio, la carencia de criterios uniformes relacionados con las actividades encaminadas al cuidado, manejo y utilización de animales con fines de investigación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y enseñanza, han provocado que el cuidado, el trato y la aplicación de técnicas experimentales practicadas en estos animales, sea ejercida en forma inadecuada, representando graves daños en el bienestar de los mismos.

Que para lograr resultados confiables en la investigación científica, la docencia biomédica y el control de calidad, así como utilizar el menor número de animales posible, es necesario contar con animales de laboratorio en condiciones óptimas.

Que cuando se utilizan para fines experimentales procedimientos cuestionables, inaceptables o contrarios a los principios de ética, éstos pueden causar graves daños en el bienestar de los animales.

Que el trato y la atención inadecuada relacionada con las maniobras para la movilización de los animales de laboratorio, contribuye a elevar los factores de estrés que los hacen susceptibles a contraer enfermedades.

Que en virtud de lo anterior y como consecuencia del proceso de globalización en el que México se encuentra inmerso, es necesario establecer criterios uniformes que permitan regular eficientemente la operación de las actividades relacionadas con la producción, cuidado, manejo y uso de los animales de laboratorio, a fin de favorecer el bienestar de éstos, protegiendo al mismo tiempo su salud.

Que para alcanzar los objetivos señalados en los párrafos anteriores, con fecha 6 de diciembre de 1999, se publicó en el **Diario Oficial de la Federación**, el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio,

iniciando con ello el trámite a que se refiere la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; razón por la cual, con fecha 18 de junio de 2001, se publicaron las respuestas a los comentarios recibidos con relación a dicho proyecto.

Que en virtud del resultado del procedimiento legal antes indicado, se modificaron los diversos puntos que resultaron procedentes y por lo cual, se expide la presente Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

ANEXO 2

México D.F. a 13 de Diciembre 2013

Dra. Judith López Zepeda

Jefe de Enseñanza e Investigación HCSAE, PEMEX

PRESENTE

Ante todo un cordial saludo y al mismo tiempo le informo que el proyecto de investigación para elaboración de tesis titulado:

ALTERNATIVA AL TRATAMIENTO DE QUEMADURAS MEDIANTE EL EMPLEO DE UN SUBSTITUTO DÉRMICO, CONFORMADO POR UN SPRAY DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES AISLADAS DE GRASA CORPORAL. ESTUDIO EXPERIMENTAL EN PORCINOS RAZA YORKSHIRE-LANDRACE.

Se llevará a cabo de acuerdo con los lineamientos descritos por la NOM-062-ZOO-1999 por lo cual **NO AMERITA** carta de consentimiento informado.

Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes agradecer su invaluable apoyo y sus finas atenciones.

Quedo a sus órdenes.

Siempre agradecido.

Atentamente:

Autor: Miguel Eljure Eljure

ccp:

Tutor: Dr. Cuauhtémoc Márquez Espriella

ANEXO 3

CERTIFICADO DE CALIDAD CELULAR

Fecha: 19/07/2013

Hora de cosecha: 16:00 hrs

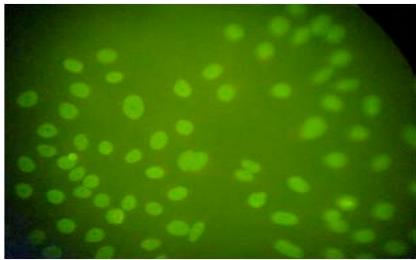
Células: PEMEX Quemaduras

Cantidad celular: 1×10^6 cel's

Volumen: 100 . μ L

Resultado microbiológico: Sin desarrollo de bacterias, hongos y levaduras a las 72 hrs

Resultado microplasma: Negativo a la cosecha

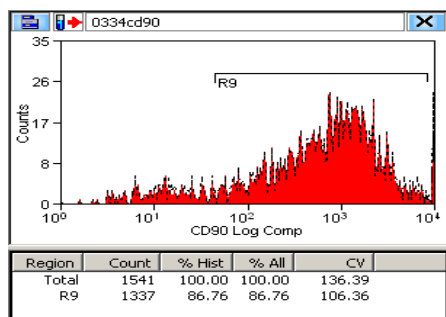
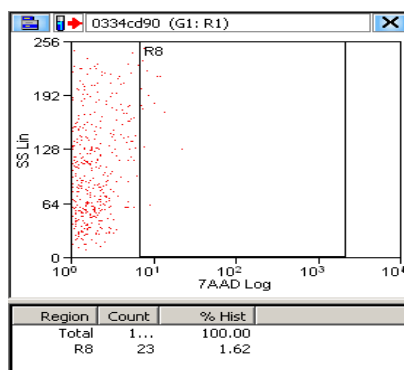
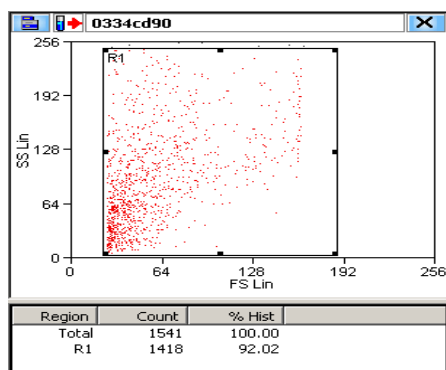


Resultado serología infecciosa donador:

VIH	NEGATIVO
HCV	NEGATIVO
HBV	NEGATIVO
VDRL	NEGATIVO

Medio de suspensión: solución de transporte enriquecido con nutrientes que mantienen la viabilidad celular.

CITOMETRIA DE FLUJO CELULAS MESNQUIMALES (CD90 y 7AAD)



El 99% de las células expresan el marcador cd90 específico del linaje mesenquimal y una viabilidad del 99%.

-
- ⁱ WHO: World report on child injury prevention (2012).
- ⁱⁱ Burn Incidence Fact Sheet, American Burn Association (2015).
- ⁱⁱⁱ Alvizu, C. S. Manejo Inicial del Paciente Quemado. Urgencia UC (2004).
- ^{iv} CENIAQ
- ^v Hansbrough, J.F., Hansbrough, W. Pediatric (2008).
- ^{vi} Otkrock Z, Mahfouz R, Makarem J et al. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood cell, Molecules, and Diseases* 2007; 39:212-220.
- ^{vii} Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Mar 15; 72(4): 570-85.
- ^{viii} Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK., Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; 284:143-147.
- ^{ix} Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant.* 1997 Mar-Apr;6(2):125-34., Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 2003 Dec;48(12):3464-74., Ringe J, Kaps C, Schmitt B, Büscher K, Bartel J, Smolian H, et al. Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. *Cell Tissue Res.* 2002 Mar;307(3):321-7. Epub 2002 Feb 26.
- ^x Phinney DG, Kopen G, Isaacson RL, Prockop DJ. Plastic adherent stromal cells from the bone marrow of commonly used strains of inbred mice: variations in yield, growth, and differentiation. *J Cell Biochem.* 1999 Mar 15; 72(4): 570-85.
- ^{xi} D'Ippolito G, Schiller PC, Ricordi C, Roos BA, Howard GA. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999 Jul; 14(7): 1115-22.
- ^{xii} Digirolamo CM, Stokes D, Colter D, Phinney DG, Class R, Prockop DJ. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *British Journal of Haematology.* 1999 Nov; 107(2): 275-81.
- ^{xiii} Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, et al. Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Eng.* 2002 Oct; 8(5): 739-51.
- ^{xiv} Fukumoto T, Sperling JW, Sanyal A, Fitzsimmons JS, Reinholz GG, Conover CA, et al. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis Cartilage.* 2003 Jan; 11(1): 55-64.
- ^{xv} De Ugarte DA, Morizono K, Elbarbary A, Alfonso Z, Zuk PA, Zhu M, et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.* 2003; 174(3): 101-9.

^{xvi} Shake JG, Gruber PJ, Baumgartner WA, Senechal G, Meyers J, Redmond JM, Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg.* 2002 Jun;73(6):1919-25; discussion 1926.